

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



LOS ACEITES ESENCIALES DE LAUREL (*Laurus nobilis*) Y CLAVO (*Syzygium aromaticum*) UNA ALTERNATIVA FRENTE A *Fusarium sambucinum* AISLADO DEL ARROZ

TRABAJO FIN DE GRADO EN
INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y
DEL MEDIO RURAL CURSO
ADAPTACIÓN

ALUMNO/A:

Beatriz Santiago Pinazo

TUTOR/A ACADÉMICO:

Prof. Dña. M^a Pilar Santamarina Siurana

COTUTOR ACADÉMICO:

Prof. Dña. Josefa Roselló Caselles

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, Noviembre 2014

Tipo de Licencia:



TÍTULO DEL TRABAJO: Los aceites esenciales de Laurel (*Laurus nobilis*) y Clavo (*Syzygium aromaticum*) una alternativa frente a *Fusarium sambucinum* aislado del arroz.

RESUMEN:

Los aceites esenciales han mostrado en diversos trabajos propiedades antibacterianas y antifúngicas. En el presente trabajo se estudia la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de Laurel (*Laurus nobilis*) y Clavo (*Syzygium aromaticum*) frente a *Fusarium sambucinum* aislado de cariósides de arroz, procedente de la Albufera de Valencia.

La adición de los aceites de Laurel y Clavo al medio de cultivo consiguió reducir solo un 26% en el primer caso, y hasta un 71% en el segundo, la velocidad de crecimiento de *Fusarium sambucinum*, además de modificar la forma de crecimiento, el color, la esporulación y la textura de las colonias.

La inhibición del crecimiento miceliar (MGI) para cada uno de los aceites fue del 24% para el caso del aceite de Laurel y del 75% para el aceite de Clavo.

El aceite esencial de clavo podría ser una alternativa para el control de *Fusarium sambucinum* en productos almacenados, y en la conservación de alimentos y granos, ya que cada vez hay más productos químicos sintéticos prohibidos para el control de hongos fitopatógenos.

Palabras clave: Aceites esenciales, capacidad antifúngica, laurel, clavo, *Fusarium sambucinum*.

ALUMNO/A:

Beatriz Santiago Pinazo

TUTOR/A ACADÉMICO:

Prof. Dña. M^a Pilar Santamarina Siurana

COTUTOR ACADÉMICO:

Prof. Dña. Josefa Roselló Caselles

VALENCIA, Noviembre 2014

ABSTRACT

Essentials oils have documented in numerous studies antibacterial and antifungal properties .In this work is evaluated the antifungal activity of Bay leaf (*Laurus nobilis*) and Clove (*Syzygium aromaticum*) essentials oils against the growth of the fungi *Fusarium sambucinum* isolated from rice caryopses from the Albufera of Valencia.

The addition of bay leaf and clove oils to culture medium reduced a 26% in the first case, and until a 71% in the second, the speed of growth of *Fusarium sambucinum*, but also modified the form of growth, color, sporulation and texture of the fungal colonies.

Mycelial growth inhibition (MGI) for each of the oils was 24% for the case of bay leaf oil and 75% for clove oil.

Clove oil could provide an alternative for controlling *Fusarium sambucinum* in stored products, and in the preservation of aliments and grains, as more and more synthetic chemicals products banned for the control of phytopathogenic fungi.

Keywords: Essential oils, antifungal activity, bay leaf, clove, *Fusarium sambucinum*.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a M^a Pilar Santamarina la oportunidad de haber realizado este trabajo en su departamento.

A Pepa Roselló por su ayuda y colaboración en todo momento.

A mi compañera de curso de adaptación y amiga, Ana Gigante, juntas hemos conseguido llegar al final del camino.

Por último, dar las gracias a todo mi familia, sin su apoyo y ayuda no hubiera sido posible realizar este curso.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. LOS HONGOS	1
1.1.1. Características generales	1
1.1.2. Género <i>Fusarium</i>	2
1.1.2.1. <i>Fusarium sambucinum</i>	3
1.1.2.1.1. <i>Fusarium sambucinum</i> en arroz	4
1.2. ACEITES ESENCIALES	5
1.2.1. Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales	5
1.2.2. Aceite esencial de Laurel	6
1.2.3. Aceite esencial de Clavo	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. MATERIAL	10
3.1.1. Hongo	10
3.1.2. Aceites esenciales	10
3.1.3. Aparatos y material de laboratorio	10
3.2. MÉTODOS	11
3.2.1. Medios de cultivo	11
3.2.2. Identificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales	11
3.2.3. Bioensayos de la actividad de los aceites esenciales	11
3.2.4. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelial (MGI)	12
3.2.5. Análisis estadístico	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. Composición química de los aceites esenciales de clavo y laurel	13
4.2. Crecimiento de <i>Fusarium sambucinum</i> y actividad antifúngica de los aceites esenciales de clavo y laurel	14
4.3. Efecto de los aceites esenciales de clavo y laurel en la inhibición del crecimiento micelial de <i>Fusarium sambucinum</i>	18
4.4. Análisis estadístico	18
5. CONCLUSIONES	20
6. BIBLIOGRAFIA	21
ANEXOS	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Detalle al microscopio óptico de los macroconidios de <i>Fusarium sambucinum</i> (x400).	3
Figura 2. Árbol del laurel (<i>Laurus nobilis</i> L.) (Figura tomada de Flora Ibérica).....	7
Figura 3. Árbol del clavo (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & Perry) (Foto tomada de Koehler's Medicinal-Plants).....	8
Figura 4. Crecimiento radial (mm) de <i>Fusarium sambucinum</i> en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel y PDA-Clavo.....	14
Figura 5. Velocidad de crecimiento (mmd-1) de <i>Fusarium sambucinum</i> en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Clavo y PDA-Laurel.	15
Figura 6. Comparación del crecimiento micelial de <i>Fusarium sambucinum</i> en los distintos medios ensayados a los 7 días de inoculación: A) Colonia de <i>F. sambucinum</i> en PDA (izq.) y PDA-Clavo (dcha.); B) Colonia de <i>F. sambucinum</i> en PDA (izq.) y PDA-Laurel (dcha.).	16
Figura 7. Crecimiento diario de <i>Fusarium sambucinum</i> en medio PDA, PDA-Clavo y PDA-Laurel a lo largo de los siete días de lectura.....	17
Figura 8. Intervalos LSD de comparación de medias para los distintos niveles de factor esencia en <i>Fusarium sambucinum</i>	19

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales de clavo y laurel.....	13
Tabla 2. Análisis de la varianza del crecimiento de <i>Fusarium sambucinum</i> frente al factor esencia (e).....	18

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS HONGOS

1.1.1. Características generales

Los hongos son un grupo muy amplio y diverso que incluye levaduras, mohos y hongos carnosos. Son heterótrofos y necesitan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono. La mayoría son saprófitos y obtienen los nutrientes por descomposición de la materia orgánica muerta, otros son parásitos, viven en el interior o sobre vegetales, animales y humanos, causando enfermedades. La mayoría viven como saprófitos en el suelo y agua, donde descomponen principalmente materia vegetal. Son organismos eucarióticos que se reproducen por medio de esporas y que no pueden realizar la fotosíntesis ya que están desprovistos de clorofila (Santamarina y col. 1997)

Los hongos causan la mayoría de las enfermedades conocidas de plantas, constituyen la base de procesos industriales en los que interviene la fermentación (elaboración de pan, vinos, cervezas) y son responsables de la fabricación de varios antibióticos (Mader y Windelspecht, 2013).

Los hongos son a la vez destructivos y beneficiosos para la agricultura. Por una parte son los descomponedores primarios de materiales orgánicos, contribuyendo de forma significativa a la descomposición de la materia orgánica y al reciclado de nutrientes, pero por otro lado son responsables de los daños que afectan a las cosechas a través de las enfermedades que provocan en plantas. La contaminación fúngica de los productos agrícolas es un problema crónico y conlleva la disminución en cantidad y calidad de las cosechas y por tanto de los alimentos. También los hongos pueden degradar productos que son útiles para la economía humana, por ejemplo los productos alimentarios cuando se almacenan mal, frecuentemente están expuestos al biodeterioro por hongos, con el resultado de que sus cualidades como alimentos se ven disminuidas. Además los hongos con frecuencia producen compuestos tóxicos cuando crecen sobre alimentos almacenados. Sólo los hongos fitopatógenos provocan una pérdida de cerca del 20% de los principales alimentos y cultivos de mayor importancia económica (Agrios, 1996; Wainwright, 1995; Santamarina y col. 1997).

1.1.2. Género *Fusarium*

Fusarium es un extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en plantas. Presenta especies fitopatógenas, la mayoría de ellas son saprófitas y relativamente abundantes en la microbiota del suelo, que causan graves enfermedades principalmente en los cereales, aunque también puede afectar a otros vegetales y frutas. Su importancia no se debe tan solo a la pérdida de las cosechas, sino también a la producción de micotoxinas. Estas micotoxinas pueden estar presentes en los cereales y sus productos, produciendo síndromes de intoxicación en animales y llegando a la cadena alimenticia de los humanos. Se considera que *Fusarium* es el género productor de toxinas de mayor prevalencia en las regiones templadas de hemisferio norte (Soriano del Castillo, 2007).

Las micotoxinas son compuestos que tienen lugar cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria. Son moléculas relativamente pequeñas que pueden contaminar los alimentos, los piensos, o las materias primas utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y trastornos, denominados micotoxicosis, y que resultan tóxicas para el hombre o los animales. Las toxinas más comunes producidas por especies del género *Fusarium* son los tricotecenos, la zearalenona, la moniliformina y las fumonisinas. Estos metabolitos se pueden sintetizar tanto durante el cultivo de la planta como durante el almacenamiento (Soriano del Castillo, 2007).

Los miembros del género *Fusarium* producen típicamente dos tipos de conidios, que reciben la denominación de macroconidios y microconidios, debido a sus tamaños respectivos. Ambos tipos son producidos a partir de los fiálides. Tanto la formación de conidios como de fiálides tiene lugar en el interior de unas falsas cabezas que finalmente se rompen liberándolos (Sempere, 2009).

Los macroconidios son estructuras largas, multiseptadas, en forma de media luna o de canoa, que por lo general están ubicadas en los esporodoquios. Los microconidios, pequeños, suelen ser unicelulares y de forma esférica u ovalada. Es también frecuente encontrar conidios que parecen intermedios entre los microconidios y macroconidios.

Doohan y col. (2003) observaron que entre los factores más importantes que influyen en las enfermedades producidas por las especies del género *Fusarium* en cereales se encuentran la temperatura y la humedad. Algunos autores ya señalaron la importancia de estos dos parámetros medioambientales en especies de este género y

demonstraron su influencia en la geminación, crecimiento y producción de micotoxinas (Miedaner y Perkowski, 1996; Ligia y Marina, 2002; Llorens y col., 2004).

1.1.2.1. *Fusarium sambucinum*

Procedente de género *Fusarium*, es un hongo patógeno que ataca a un amplio rango de plantas. Su hábitat normalmente es sobre cereales, piensos, patatas, hierbas, cortezas de árboles, etc.

Su telemorfo es *Gibberella pulicaris* (Fr:Fr) Sacc. Las colonias en PDA y a 25°C tienen un diámetro en 4 días de 3,5-5,9 cm, presentan un color naranja, pero cuando maduran adquieren un tono marrón oscuro casi negro. El micelio aéreo es algodonoso, de un blanco a un amarillo rosa. El reverso es blanco, amarillento, rosa, o gris rojizo. Es extraño ver cultivos con una coloración rojo oscura. Las conidiosporas surgen solo lateralmente en monofialidas, más tarde se bifurcan muy poco. Los macroconidios son uniformes en tamaño y forma con una marcada curva dorsiventral, paredes gruesas, 3-7 septos (Figura 1). Las clamidiosporas pueden estar presentes, solitarias, encadenadas y en grupos (Samson y col., 2004).

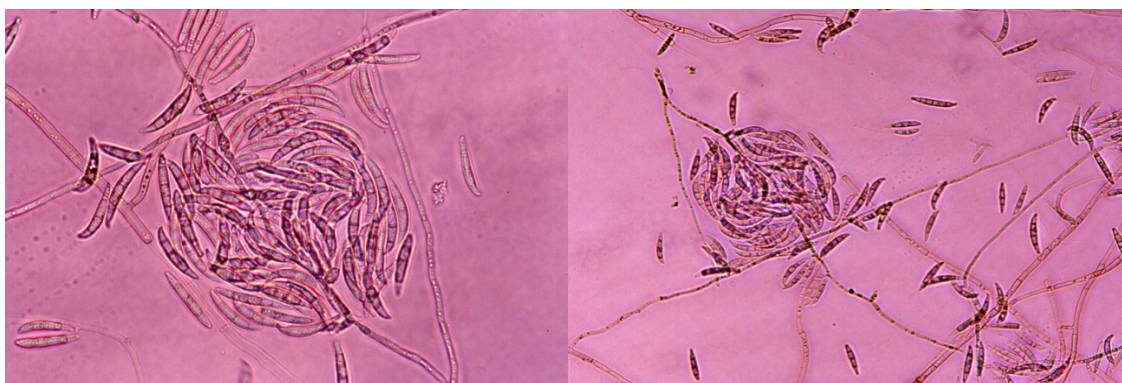


Figura 1. Detalle al microscopio óptico de los macroconidios de *Fusarium sambucinum* (x400).

Es un hongo filamentoso de climas moderados, distribuido ampliamente en frutas, cereales, etc. Destaca por ser una especie toxigénica productora de micotoxinas entre las que se encuentran la zearalenona (ZEA), la fusarina C, el ácido furárico, bobericina (BEA) y los tricotecenos: diacetoxiescirpenol (DAS), monoacetoxiescirpenol (MAS), toxina T-2, neosolaniol (NEO) y deoxinivalenol (DON), como principal grupo. Además, se ha descrito una nueva toxina, la sambutoxina (Sempere y col., 2007).

Respecto a su ecofisiología, *Fusarium sambucinum* experimenta un crecimiento micelial máximo a una temperatura de 25°C y a la actividad de agua de 0,995 a_w , mientras que no crece a una actividad de agua de 0,85 a_w (Sempere, 2009). Backhouse y col. (2001) han descrito a *Fusarium sambucinum* como una especie cosmopolita que vive muy bien en ambientes con medias anuales de entre 5 y 15°C.

1.1.2.1.1. *Fusarium sambucinum* en arroz

Cuando el grano de arroz es cosechado, su superficie está contaminada por diversos propágulos fúngicos. Si éste no es secado y almacenado correctamente, propiciará la germinación de las esporas y el desarrollo micelial, produciendo una pérdida de la calidad inicial del grano y un riesgo potencial por una posible contaminación de micotoxinas, que puede ocasionar graves enfermedades en el ser humano a largo plazo.

La producción de micotoxinas viene determinada por una serie de factores, como son las condiciones ambientales (humedad relativa, temperatura) y la disponibilidad de nutrientes adecuados, de esta forma una misma cepa puede no producir micotoxinas en un momento determinado y si producirlas en otro. Además, la presencia de otros hongos puede estimular o inhibir la formación de toxinas, debido a un efecto de competitividad (Santamarina y col., 1995).

La micoflora del grano del arroz es la principal causa de su deterioro, y su aparición viene determinada por varios factores, entre los que destacan la temperatura y la actividad de agua.

La incidencia de *Fusarium sambucimun* en la micobiota dominante del arroz de Valencia no es muy elevada, con porcentajes inferiores al 15%, aunque es un hongo de campo, puede aparecer también en el almacén cuando las condiciones le son favorables. Ocasiona una depreciación comercial del grano, produciendo cambios en sus propiedades físicas y químicas, como aparición de coloraciones indeseables, pérdida de propiedades nutricionales, disminución del poder germinativo, aparición de ciertos metabolitos, etc. (Sempere y col., 2007).

Estos cambios se producen debido a que cuando un hongo contamina un grano, las hifas penetran y secretan enzimas hidrolíticos que lo degradan parcialmente, siendo la función primaria del micelio fúngico establecerse y crecer en un medio, absorbiendo

nutriente y agua (Moss, 1992). De esta manera provocan alteraciones muy diversas, como la destrucción de proteínas, sustancias de reserva, pérdidas en la materia seca (Lacey y Magan, 1991) y alteraciones de las células de los tejidos (Schimdt, 1991); también disminuyen la calidad, el poder germinativo, el vigor, el valor nutricional y la digestibilidad (Lacey y Magan, 1991).

1.2. ACEITES ESENCIALES

Son líquidos aromáticos obtenidos de diferentes órganos de la planta: flores, raíces, hojas, tallos, frutos, semillas, etc. Pueden ser obtenidos por presión, fermentación, o extracción, pero el método más común para la producción comercial es el de destilación por vapor.

Se conocen alrededor de unos 3000 aceites esenciales, de los cuales unos 300 son los más importantes comercialmente, destinados para el mercado de condimentos y fragancias (Burt, 2004).

Se caracterizan por un olor fuerte y son formados por plantas aromáticas como metabolitos secundarios. En la naturaleza juegan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también frente a herbívoros mediante la reducción de su apetito por tales plantas (Bakkali y col., 2008).

Son compuestos naturales complejos, volátiles sintetizados por las plantas aromáticas. Juegan un papel ecológico importante, ya que están envueltos en las interacciones entre las plantas, inhiben o estimulan la germinación de otras especies vegetales, también representan una defensa contra herbívoros, insectos, hongos y patógenos (Santamarina y col., 2012).

1.2.1. Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales

Desde hace mucho tiempo se han reconocido las propiedades antibacterianas de algunos aceites esenciales. Además de propiedades antibacterianas, los aceites o sus componentes han mostrado también propiedades antivíricas, antifúngicas e insecticidas.

La capacidad antifúngica y antibacteriana de los aceites esenciales de muchas especies de plantas han sido probadas por diferentes autores (Burt, 2004; Pirajno y col., 2004; El Bouzidi y col., 2012; Marey y col., 2012).

Existen numerosos estudios que revelan la actividad antimicrobiana, aunque no todos presentan la misma actividad y ésta dependería de sus componentes. En este sentido, Fisher y Phillips (2006) estudiaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de limón, naranja dulce y bergamota y de sus componentes principales.

Por otro lado, la actividad antimicrobiana de los aceites de pimienta negra, clavo, orégano, geranio, nuez moscada y tomillo fue examinada por Dorman y Deans (2000), quienes además determinaron los componentes volátiles que podrían contribuir a su actividad. El aceite con un gran espectro de acción fue el de tomillo, seguido de orégano, clavo, nuez moscada, pimienta negra y geranio. La actividad de los aceites estaría relacionada con la composición de los volátiles de los aceites de las plantas y sus grupos funcionales, y una posible interacción sinérgica entre sus componentes. Los componentes con estructura fenólica como el carvacrol, el eugenol y el timol, fueron muy efectivos frente a los microorganismos.

A pesar de los beneficios que puede suponer el empleo de determinados aceites esenciales en el aumento de la vida útil de los productos mínimamente procesados, junto con la mejora en su actividad antioxidante, su uso también puede aportar a los mismos, sabores y aromas extraños, lo cual puede limitar su aplicación (Almela, 2012).

1.2.2. Aceite esencial de Laurel

El nombre científico del laurel es *Laurus nobilis* L.. El género *Laurus* pertenece a la familia de Lauráceas, a la que da nombre.

El laurel (Figura 2) es un árbol dioico de 2 a 6 m, de hoja perenne. Las ramas son erguidas y recubiertas por una corteza lisa. Las hojas son alternas, lanceoladas, puntiagudas, coriáceas, generalmente onduladas en el borde, tienen ápice agudo y base atenuada. Miden unos 3-9 cm de longitud y poseen corto peciolo, son de color verde oscuro brillante por el haz y verde pálido y mate por el envés. Son muy aromáticas. Las flores se agrupan en la axila de las hojas en pequeñas umbelas pedunculadas. Son pequeñas, olorosas, amarillas o blancas. Florece en primavera, entre marzo y mayo. Los frutos son bayas, ovoides, del tamaño de un guisante grueso, de color azul oscuro, o negro en la madurez, que contienen una sola semilla.

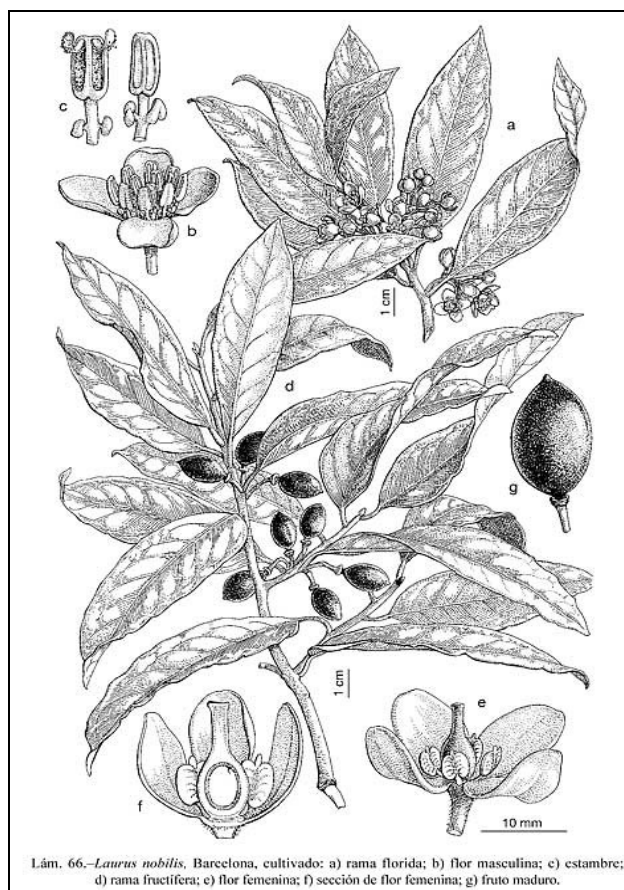


Figura 2. Árbol del laurel (*Laurus nobilis* L.) (Figura tomada de Flora Ibérica).

Crece espontáneamente en los países de la cuenca mediterránea hasta unos 1200 m de altitud. Es originario del Mediterráneo y de Asia menor (Mendiola y Martín, 2009).

Al laurel se le atribuyen propiedades estimulantes, diuréticas, estomacales, carminativas y expectorantes.

En el aceite esencial del laurel (Sanz-Berzosa y col., 2013) los componentes oxigenados suponen un 78,8% del total de su composición, siendo los mayoritarios el eucapitol (51%) y el ester α -terpinenyl acetate (12.9%), seguidos de los esteres bornyl acetate (0.5%) y linalyl acetate (0.25%). Otros componentes son los hidrocarburos (monoterpenos y sesquiterpenos) que forman el 18% de su composición.

1.2.3. Aceite esencial de Clavo

El nombre científico del clavo es *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. El género *Syzygium* pertenece a la familia Myrtaceae.

El clavo de olor es una especia de un árbol tropical originario de Indonesia, siendo los botones secos (flores que aún no abren) los que son usados como especia. El árbol del clavo es perenne y crece hasta una altura de 10 a 20 metros. Tiene hojas lanceoladas e inflorescencias racimosas. Las yemas florales inicialmente presentan un color pálido que gradualmente cambia al verde, después de lo cual comienzan a adquirir un color rojizo brillante indicativo de que están listos para ser recolectados. Usualmente se cosechan cuando alcanzan una longitud de 1,5 a 2 cm, y constan de un largo receptáculo que contiene al ovario; sobre el receptáculo se insertan los demás verticilios florales: cuatro sépalos, cuatro pétalos y numerosos estambres (Torres, 2009).

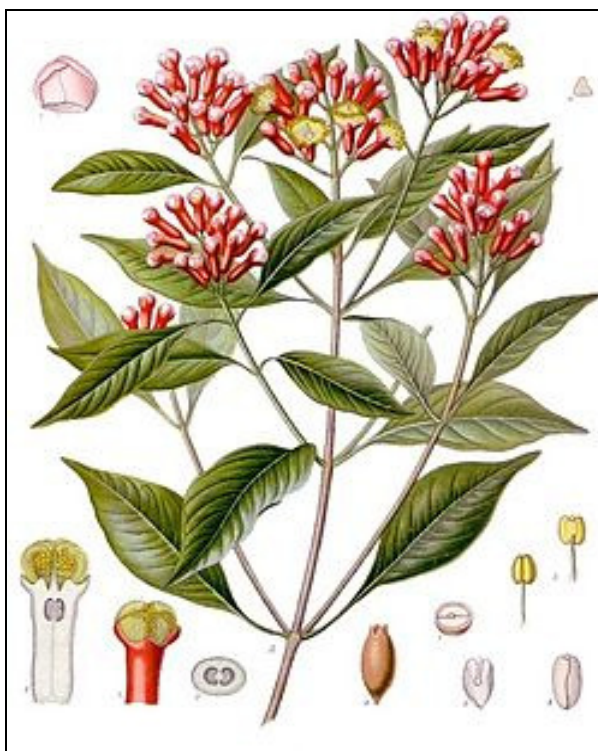


Figura 3. Árbol del clavo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) (Foto tomada de Koehler's Medicinal-Plants)

En el aceite esencial del clavo (Sanz-Berzosa y col., 2013) los compuestos oxigenados representan el 90,3% de su composición, siendo el eugenol el que aparece en mayor proporción (89,8%). Los hidrocarburos (monoterpenos y sesquiterpenos) suponen un 9% de su composición.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En el Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural (UPV) se llevan a cabo una serie de trabajos relacionados con la capacidad antifúngica de los aceites esenciales frente a distintos hongos patógenos de cultivos o de almacén. Este trabajo forma parte de un proyecto financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación y Desarrollo (PAID-05-10) de la UPV.

En el presente trabajo se estudia la capacidad antifúngica de los aceites esenciales de Laurel (*Laurus nobilis*) y Clavo (*Syzygium aromaticum*). El hongo utilizado en el ensayo es *Fusarium sambucinum* aislado de cariósides de arroz. Este estudio nos permitirá conocer el grado de inhibición de crecimiento micelial de cada uno de los aceites.

El objetivo final es conocer si los aceites esenciales de clavo y laurel podrían ser una alternativa para el control de *Fusarium sambucinum* en productos almacenados, y en la conservación de alimentos y granos, ya que cada vez hay más productos químicos sintéticos prohibidos para el control de hongos fitopatógenos.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Hongo

El hongo utilizado *Fusarium sambucinum* Fuckel LBEA 2161 fue aislado de carióspsides de arroz procedente de la zona de producción arroceras de la Albufera de Valencia. El hongo se identificó en el laboratorio de Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales y confirmada su clasificación por Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Fungal Biodiversity Centre, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science.

3.1.2. Aceites esenciales

El aceite esencial de laurel (*Laurus nobilis* L.) extraído de hojas fue suministrado por la casa comercial ESENTIAL ARÔMS y extraído de manera natural a través de la primera presión en frío por destilación al vapor de agua, con número de lote 719B032807. La composición indicada por el fabricante es: 1,8 cineol (eucaliptol), acetato α -terpinilo y linalol.

El aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry) extraído de las hojas fue suministrado por la casa comercial GUINAMA, con número de lote 9449600032 y según la composición del fabricante con un porcentaje de eugenol superior al 85%.

3.1.3. Aparatos y material de laboratorio

- Autoclave RAYPA AES-75
- Cabina de flujo laminar INDELAB
- Estufa de cultivo RAYPA I-288
- pH-metro CRISON GLP 21
- Balanza analítica KERN PLB 1000-2
- Agitador orbital SELECTA ROTABIT
- Cámara fotográfica digital NIKON E885
- Cámaras frigoríficas
- Cromatografo de gases
- Material fungible usado en el laboratorio de Botánica (pipetas, placas petri, asas de siembre, sacabocados, matraz erlenmeyer, mechero gas)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Medios de cultivo

El fundamento de los medios de cultivo para la microbiología reside en poner al alcance de los microorganismos una fuente de nutriente que permita su crecimiento.

En este estudio el medio de cultivo utilizado fue Agar Dextrosa Patata (PDA) que tiene la siguiente composición:

Infusión de patata	200,0 g/l
Dextrosa	20,0 g/l
Agar	17,0 g/l
Agua destilada	1000 ml

3.2.2. Identificación de los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales

La identificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas mediante la comparación de su espectro de masas con la base de datos disponible en el cromatógrafo gases-masas y la comparación del índice de Kovats de cada compuesto con el descrito en la bibliografía. Asimismo se ha comprobado la identidad de algunos de los compuestos comparando sus espectros de masas y sus índices de Kovats con los de muestras patrón.

Las condiciones del cromatógrafo de gases acoplado al espectrómetro de masas son: Volumen de inyección: 1 μ L. Split, Split-ratio-30:1. Flujo del gas portador: 1 mL/min. Column: HP-5MS UI (agilent); 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m; T^a max. Column: 350°C. Rampa: 60°C 5 min; 3°C/min a 180°C; 20°C/min hasta 280°C (10 min). Rango de masas: 30-500 m/z. Modo de adquisición: scan.

3.2.3. Bioensayos de la actividad de los aceites esenciales

El aceite esencial fue disuelto, mezclado y homogeneizado por agitación en matraces con medio de cultivo PDA/Tween 20 (0.1%), previamente esterilizado, cuando aún está líquido, se adicionó a la concentración de 300 μ g/mL, y se repartió en cápsulas Petri de 90x15 mm.

El hongo se sembró a modo de explantes discoidales de 8 mm de diámetro tomados con un sacabocados de una colonia de siete días de desarrollo, y se colocaron en el centro de las cápsulas Petri conteniendo el aceite esencial. El

experimento se incubó a 25°C durante 7 días. El crecimiento micelar se evaluó midiendo diariamente dos diámetros perpendiculares de la colonia, y se calculó la velocidad de crecimiento. Se realizaron seis repeticiones por tratamiento. Las cápsulas Petri control contenían únicamente PDA/Tween 20 (0.1%).

3.2.4. Cálculo de la inhibición del crecimiento micelar (MGI)

La inhibición del crecimiento micelar se calculó el día 6 utilizando la siguiente fórmula (ALBUQUERQUE *y col.*, 2006).

$$MGI = [(DC-DO)/DC] \times 100$$

Donde DC es la media del diámetro de las colonias en placas no tratadas con aceite y DO es la media del diámetro de las colonias en placas tratadas con aceite esencial, ambos a día 6.

3.2.5. Análisis estadístico

Los resultados de crecimiento micelar se sometieron al análisis de la varianza (ANOVA). También se representaron los intervalos LSD de comparación de medias del factor esencia, con valores de significación de $P \leq 0,05$. El programa estadístico utilizado fue Statgraphics Plus 5.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Composición química de los aceites esenciales de clavo y laurel

La identificación de la composición de los aceites esenciales se realizó en colaboración con el Departamento de Química de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, con la profesora Isidora Sanz-Berzosa.

Según el estudio realizado los componentes mayoritarios de los aceites esenciales de clavo y laurel son los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Compuestos mayoritarios presentes en los aceites esenciales de clavo y laurel.

KI ⁽¹⁾	COMPUESTO	CLAVO (%)	LAUREL (%)
1362	eugenol	89,757	
1420	beta-caryophyllene	6,715	
1453	alpha- caryophyllene	1,917	
979	sabinene		7,474
980	beta pinene		3,255
1035	eucaliptol		50,654
1063	gamma terpinene		1,203
1001	linalool		3,655
1180	terpinen-4-ol		2,165
1193	alpha-terpineol		2,301
1357	alpha-terpinenyl acetate		12,917
1409	methyleugenol		3,803
939	alpha pinene		3,95

(1) KI= Índice de Kovats

La composición de los aceites esenciales contiene altos porcentajes de compuestos oxigenados, como ésteres, alcoholes, epóxidos y cetonas.

En el aceite esencial del clavo los compuestos oxigenados representan el 90,3% de su composición, siendo el eugenol el que aparece en mayor proporción (89,8%). Los hidrocarburos (monoterpenos y sesquiterpenos) suponen tan solo un 9% de su composición, de ellos el 6,7% corresponde al beta-caryophyllene y el 1,9 % al alpha-caryophyllene.

En el aceite esencial del laurel los componentes oxigenados suponen un 78,8% del total de su composición, siendo los mayoritarios el epóxido eucapitol con un 51% y el

ester alpha-terpinenyl acetate con un 12.9%. Otros componentes minoritarios son los esteres bornyl acetate (0.5%) y linalyl acetate (0.25%). En este aceite los hidrocarburos (monoterpenos y sesquiterpenos) forman el 18% de su composición.

4.2. Crecimiento de *Fusarium sambucinum* y actividad antifúngica de los aceites esenciales de clavo y laurel

En la Figura 4 se muestra el crecimiento radial (mm) de *Fusarium sambucinum* en los distintos medios ensayados, donde se observa que el crecimiento del hongo es muy similar en el medio PDA (control) y en el PDA-laurel durante los dos primeros días, mostrándose a partir de ese día una ligera reducción del crecimiento.

Por otro lado, se observa que el aceite de clavo inhibió totalmente el crecimiento de *Fusarium sambucinum* hasta el tercer día, ya que hasta ese día no se registraron datos de crecimiento, mostrándose a partir de ese día valores muy inferiores en comparación con el hongo crecido en PDA.

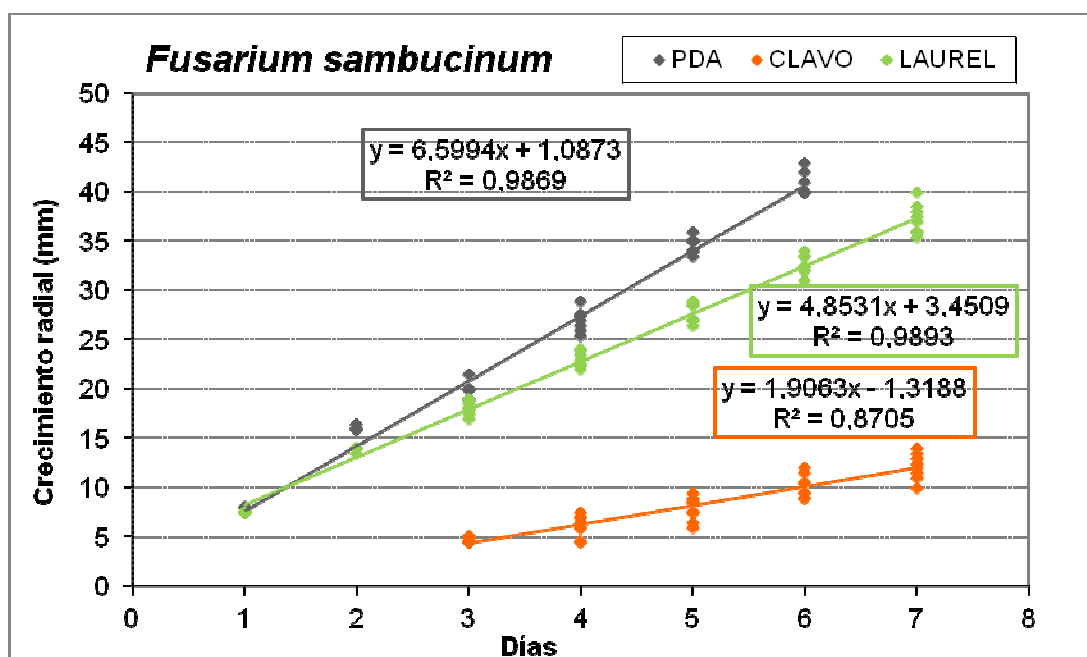


Figura 4. Crecimiento radial (mm) de *Fusarium sambucinum* en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Laurel y PDA-Clavo.

La velocidad de crecimiento de *Fusarium sambucinum* (Figura 5) fue de 6,6 mmd-1 cuando creció en el medio de cultivo PDA, mientras que cuando se adicionaron los aceites de clavo y laurel la velocidad de crecimiento se redujo a 1,9 mmd-1 y a 4,8 mmd-1 respectivamente.

La adición de los aceites de clavo y laurel consiguió reducir, a lo largo de los 7 días, en un 71% y un 26%, respectivamente, la velocidad de crecimiento de *Fusarium sambucinum*.

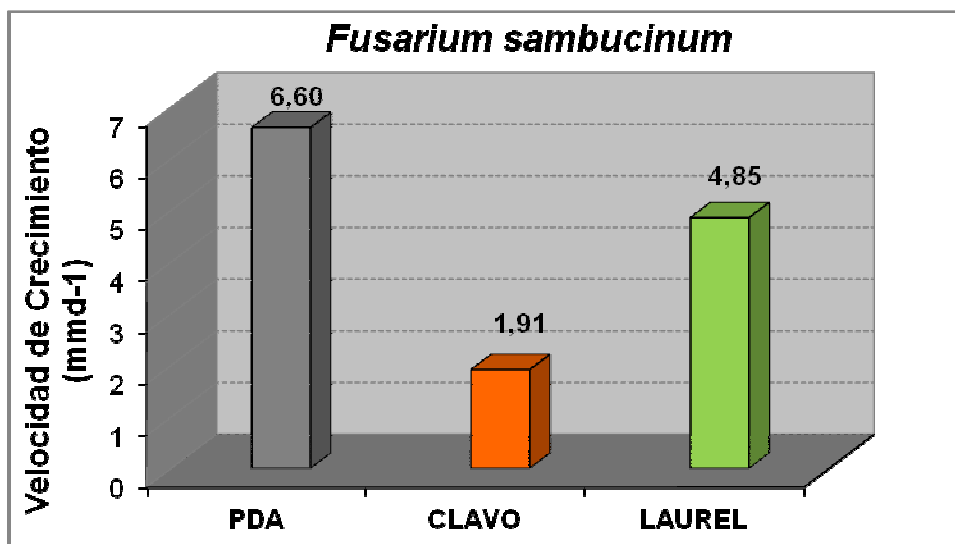


Figura 5. Velocidad de crecimiento (mmd-1) de *Fusarium sambucinum* en los distintos medios ensayados: PDA, PDA-Clavo y PDA-Laurel.

El crecimiento de *Fusarium sambucinum* en el medio PDA se caracteriza por un crecimiento rápido, ya que a los 6 días de la inoculación las colonias ocupan la totalidad de la placa. Las colonias presentaron una coloración rosácea, con un micelio aéreo abundante y algodonoso, de color blanquecino y rosáceo (Figuras 4 y 6).

El crecimiento de *Fusarium sambucinum* en el medio PDA con el aceite esencial de laurel mostró un crecimiento ligeramente inferior al del hongo crecido en PDA (Figura 6).

Por otro lado el aceite de clavo disminuyó significativamente el crecimiento micelial de *Fusarium sambucinum* a la dosis ensayada (Figura 4). Además de modificar la forma, el color, y la textura de las colonias (Figura 6), ya que se observó que las colonias presentaban una coloración más blanquecina y algodonosa.

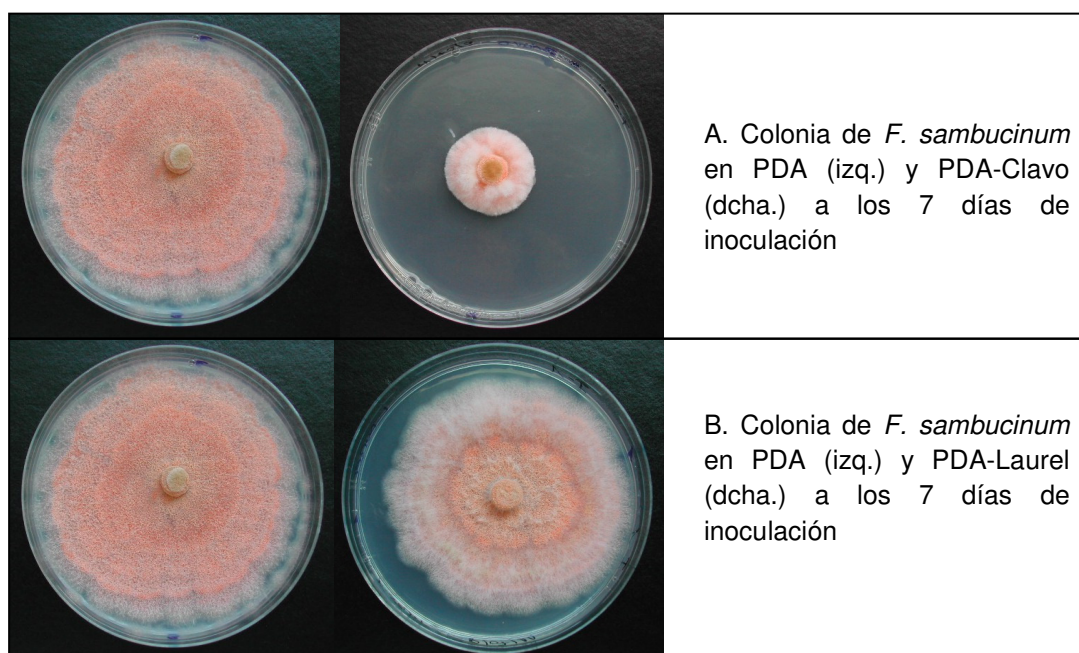


Figura 6. Comparación del crecimiento micelial de *Fusarium sambucinum* en los distintos medios ensayados a los 7 días de inoculación: A) Colonia de *F. sambucinum* en PDA (izq.) y PDA-Clavo (dcha.); B) Colonia de *F. sambucinum* en PDA (izq.) y PDA-Laurel (dcha.).

En la Figura 7 pueden observarse las medias del crecimiento radial diario a lo largo de los siete días de lecturas. Podemos ver que durante los dos primeros días el efecto de inhibición del crecimiento del hongo mediante el aceite de clavo es del 100%, puesto que el hongo no crece, mientras que en el resto de días es constante, ya que en todos ellos el porcentaje de reducción del crecimiento es similar, varía entre un 75 y 77%.

En el caso del laurel el efecto no es tan constante, el primer día se observa una reducción mínima del 3%, el día 2 un 14%, el día 3 se alcanza el máximo con un 38%, volviendo a disminuir los días siguientes, 15 % el día 4 y un 20% los días 5 y 6.

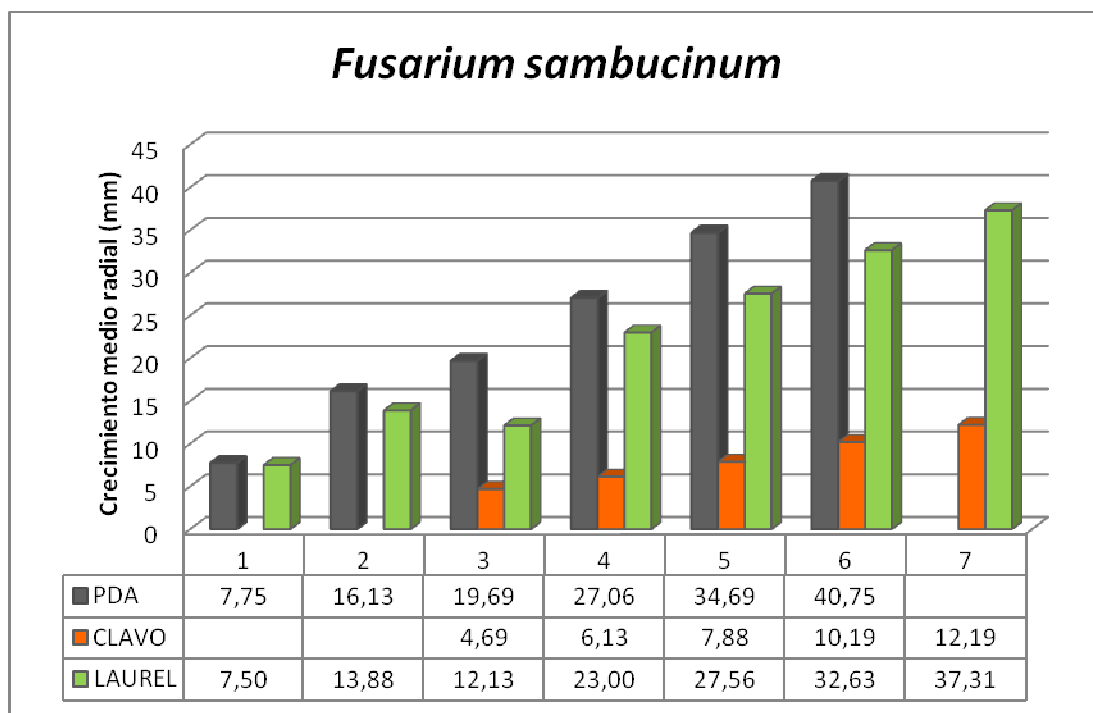


Figura 7. Crecimiento diario de *Fusarium sambucinum* en medio PDA, PDA-Clavo y PDA-Laurel a lo largo de los siete días de lectura.

Del estudio de la composición de los aceites sabemos que el aceite esencial de clavo está compuesto casi exclusivamente por eugenol ya que aparece con una proporción del 89,8%. De los datos obtenidos en el presente trabajo, en el que el aceite de clavo es el que ha mostrado una mayor inhibición del crecimiento micelial, y del estudio de otros trabajos realizados en el Departamento de Ecosistemas Agroforestales sobre la actividad antifúngica de los aceites esenciales frente a varios hongos, se observa que los aceites con mayor actividad son aquellos que contienen un alto porcentaje de fenoles.

Varios autores han estudiado el efecto del aceite de clavo sobre el crecimiento de distintas especies. Barrera y García (2008) estudiaron la disminución del crecimiento de *Fusarium* sp. utilizando aceite de clavo a una dosis de 300 µg/ml, observando un crecimiento micelial de 5 mm comparados con los 45 mm del control a los 6 días de incubación, valores inferiores a los obtenidos en el presente trabajo, donde el crecimiento fue de 10,19 mm con el aceite de clavo y 40,75 mm en el control.

Montes-Belmont y Carvajal (1998) también encontraron que el aceite esencial de clavo causaba la inhibición total del desarrollo de *Aspergillus flavus* en grano de maíz.

En otro estudio Velluti y col (2003) probaron el aceite de clavo sobre *Fusarium proliferatum*, el cual inhibió totalmente el crecimiento de este hongo.

En el caso del aceite esencial de laurel, el eucaliptol, que es el compuesto mayoritario (se encuentra en un porcentaje del 51%), ha mostrado una baja actividad antifúngica frente al hongo utilizado. De hecho la bibliografía es contradictoria respecto a los estudios de la actividad antifúngica del aceite de laurel. En algunos estudios el aceite de laurel ha activado el crecimiento fúngico (Atanda y col., 2007), mientras que en otros se ha constatado su efectividad como fungicida, fungistático e incluso como reductor de toxinas fúngicas (De Corato y col., 2010). No ha sido nuestro caso por lo que sería necesario realizar nuevas investigaciones para comprobar si aumentando la concentración de aceite, o utilizando otros géneros de hongos, se obtendría también un aumento de la actividad antifúngica.

4.3. Efecto de los aceites esenciales de clavo y laurel en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sambucinum*

Si aplicamos el cálculo del índice MGI (Micelial Growth Inhibition), otro parámetro de crecimiento utilizado por varios autores que estudian la actividad antifúngica de los aceites esenciales (Albuquerque y col., 2006; Avila-Sosa y col., 2012; Tian y col., 2011; De Corato y col., 2010), se observa que el índice MGI calculado al día 6 es de un 24% para el caso del aceite de Laurel y de un 75% para el aceite de Clavo, datos similares al porcentaje de reducción de la velocidad de crecimiento (26% y 71%, respectivamente).

4.4. Análisis estadístico

Del análisis de la varianza del factor esencia sobre el crecimiento de *Fusarium sambucinum* (Tabla 2) podemos observar que dicho factor tiene una influencia significativa sobre el crecimiento medio del hongo ya que el P-valor es menor de 0,05.

Tabla 2. Análisis de la varianza del crecimiento de *Fusarium sambucinum* frente al factor esencia (e).

Factor	GL	CM	F-ratio	P-valor
e	2	4533,83	75,35	0,0000

GL: grados de libertad; CM: cuadrado medio; F-ratio: F-Snedecor

*Significativo $P < 0,05$

Además se representaron los intervalos LSD de comparación de medias (Figura 8) para comprobar si existen diferencias significativas entre las medias de crecimiento de los distintos medios ensayados. Dicho gráfico pone de manifiesto que realmente

existen diferencias entre las medias estadísticamente significativas con un nivel del 95,0% de confianza.

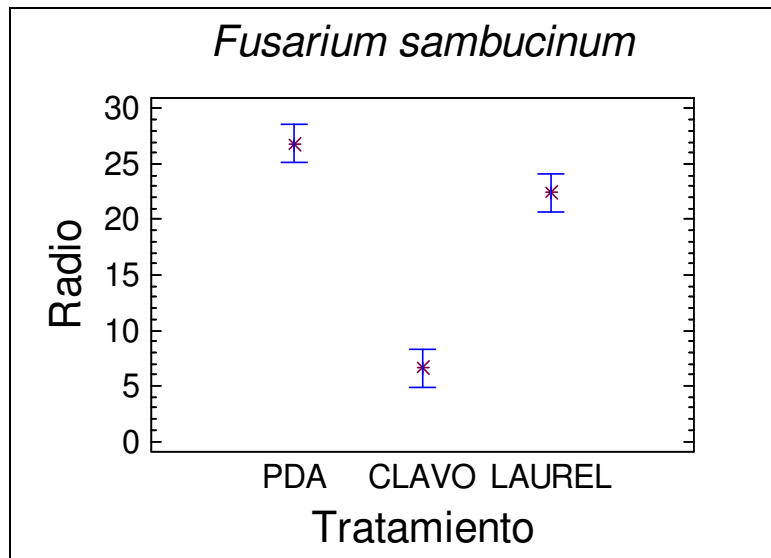


Figura 8. Intervalos LSD de comparación de medias para los distintos niveles de factor esencia en *Fusarium sambucinum*

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

- En el aceite esencial del clavo el compuesto mayoritario es el eugenol que aparece en una proporción del 90%.
- En el aceite esencial del laurel el compuesto mayoritario es el eucapitol con un 51%.
- La velocidad de crecimiento de *Fusarium sambucinum* fue de 6,6 mmd-1 cuando creció en el medio de cultivo PDA, mientras que cuando se adicionaron los aceites de clavo y laurel la velocidad de crecimiento se redujo a 1,9 mmd-1 y a 4,8 mmd-1 respectivamente.
- La adición de los aceites de clavo y laurel consiguieron reducir en un 71% y un 26%, respectivamente, la velocidad de crecimiento de *Fusarium sambucinum*.
- El aceite de clavo llegó a inhibir totalmente el crecimiento hasta el tercer día.
- El índice MGI calculado al día 6 es de un 24% para el caso del aceite de Laurel y de un 75% para el aceite de Clavo, datos similares al porcentaje de reducción de la velocidad de crecimiento.
- Del análisis de la varianza del factor esencia sobre el crecimiento de *Fusarium sambucinum* se observó que dicho factor tiene una influencia significativa sobre el crecimiento medio del hongo ya que el P-valor es menor de 0,05.
- El aceite esencial de clavo presentó una muy buena inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sambucinum*, por lo que este aceite y/o sus compuestos podrían ser una alternativa para el control de las enfermedades causadas por este hongo.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G.N. (1996) *Fitopatología*. Editorial Limusa. México.
- ALBURQUERQUE C.C., T.R. CAMARA, R.D.R. WILLADINO Y C. ULISES (2006). Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49: 527-535.
- ALMELA CAMAÑAS, C. (2012). *Incorporación de aceites esenciales en la conservación del caqui "Rojo Brillante" y melón "Piel de Sapo" mínimamente procesados*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- ATANDA, O.O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F. (2007). The potencial of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 233 and aflatoxin production. *Food Control*, 18: 601-607.
- AVILA-SOSA, R.; PALOU, E.; JIMENEZ, M.T.; NERVAÉZ-MOORILLÓN, G.; NAVARRO, A.D.; LOPEZ-MALO, A. (2012). Antigungal activity by vapor contact essential oils added to amaranth, chitosa, or tarch edible films. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 66-72.
- BACKHOUSE, D.; BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A. (2001). Biogeography of *Fusarium*. *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium* (Summerell, B.A.; Leslie, J.F.; Backhouse, D.; Bryden, W.L.; Burgess, L.W. (Eds)) *APS Press*, St Paul, MN, 122-137.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. (2008). Biological effects of essential oils-A review. *Food Chem toxicol*, 46: 446-475.
- BARRERA, L.L.; GARCIA L.J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *UDO Agrícola*, 8(1): 33-41.
- BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods, a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- DE CORATO, U.; MACCIONI, O.; TRUPO, M.; DI SANZO, G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop Protection*, 29: 142-147.
- DOOHAN, F.M.; BRENNAN, J.; COOK, B.M. (2003). Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 755-768.

- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- EL BOUZIDI, L.; ABBAD, A.; HASSANI, L.; FATTARSI, K.; LEACH, D.; MARKOUK, M.; LEGENDRE, L.; BEKKOUCHE, K. (2012). Essential oil composition and antimicrobial activity of wild and cultivated moroccan *Achillea ageratum* L.: a rare and threatened medicinal species. *Chemestry & Biodiversity*, 9: 598-605.
- FAUNA IBÉRICA, MUSEO NACIONAL DE CIENCIAS NATURALES, visto el 3 de noviembre de 2014, <http://www.fauna-iberica.mncn.csic.es/>.
- FISHER, K. Y PHILLIPS, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101 (6): 1232–1240.
- KOEHLER'S MEDICINAL PLANTS (Thomas Schöpke), visto el 14 de noviembre de 2014, <http://pharm1.pharmazie.uni-greifswald.de/allgemei/koehler/koeh-eng.htm>
- LACEY, J.; MAGAN, N. (1991). *Fungi in cereal grains: their occurrence, water and temperature relationships*. In: *Cereal grain. Micotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Ed. Elsevier, Amsterdam.
- LIGIA, M.; MARINA, H. (2002). Influence of water activity, temperature and incubation time on simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. *Food Chemistry*, 79: 315-318.
- LLORENS, A.; MATEO, R.; HINOJO, M.J.; VALLE-ALGARRA, F.M.; JIMÉNEZ, M. (2004). Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *Int J. Food Microbiol*, 94: 43-54.
- MADER, S.; WINDELSPECHT, M. (2013). *Biología*. Ed. Mc Graw-Hill. México.
- MAREY, G.I.; ABDEL RASUL, M.A.; ABDELGALELI, A.M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pest Biochem Physiol*, 103: 56-61.
- MENDIOLA, M.A.; MARTÍN, J. (2009). *Plantas aromáticas gastronómicas*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- MIEDANER, T.; PERKOWSKI, J. (1996). Correlations among *Fusarium culmorum* head blight resistance, fungal colonization and mycotoxin contents in winter rye. *Plant Breeding*, 115: 347-351.

- MONTES-BELMONT, R.; CARVAJAL, M. (1998). Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *Journal of Food Protection* vol. 61, nº 5: 616-619.
- MOSS, M.O. (1992). Secondary metabolism and food intoxication. *Moulds. J. Appl. Bact. Symposium Suppl.*, 73: 80S-88S.
- PIRAJNO, G.; SCARITO, G.; SALAMONE, A. (2004). Fungistatic activity of essential oils of *Laurus nobilis*, *mentha x piperita*, and *Ruta graveolens* against *Rhizoctonia solani* Kuenn and *Sclerotinia sclerotiorum* (L.) De Bary. *Journal of Plant Pathol.*, 86: 329-332.
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. (2004). *Introduction to Food and Air Borne Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- SANTAMARINA, M.P.; GARCÍA, F.J.; ROSELLÓ, J. (1997). *Biología y Botánica (tomo II)*. Servicio de publicaciones UPV. Valencia.
- SANTAMARINA, M.P.; GIMÉNEZ, F.J.; SABATER, C.; SANCHIS, V. (1995). Medidas para la reducción y eliminación de micotoxinas. Alimentos y piensos. *Rev. Iberoamericana de Micología*, 12: 52-59.
- SANTAMARINA, M.P.; GIMÉNEZ, S.; ROSELLÓ, J. (2012). Estudio de la actividad antifúngica del aceite esencial de Canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume) frente a *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo. *Phytoma España*, 243: 82-84.
- SANZ-BERZOSA, I.; SANTAMARINA, M.P.; ROSELLÓ, J. (2013). Composición química de aceites esenciales con potencial antifúngico. *Phytoma España*, 253: 66-68.
- SCHIMDT, H.L. (1991). *Cereal grain structure and the way wich fungi colonize kernel cell*. In: *Cereal grain. Micotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Ed. Elsevier. Amsterdam.
- SEMPERE, F. (2009). *Estudios sobre la micobiota del arroz de Valencia*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- SEMPERE, F.; ROSELLÓ, J.; SANTAMARINA, M.P. (2007). Interacciones competitivas entre *Fusarium sambucinum* Fuckel y *Phoma glomerata* (Corda) Wollenweber & Hochapfel en condiciones in vitro. *Rev Iberoam Micol.*, 24: 29-33.
- SORIANO DEL CASTILLO, J.M. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid.
- TIAN, J.; BAN, X.; ZENG, H.; HE, J.; HUANG, B.; WANG, Y. (2011). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cicuta virosa* L. var. *latisecta* Celak. *International Journal of Food Microbiology*, 145: 464-470.

- TORRES, L. (2009). *Hierbas aromáticas y especias; albahaca, perejil, canela, azafrán...* Editorial Océano. Barcelona.
- VELLUTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J.; EGIDO, J.; MARIN, S. (2003). Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumosin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *J. Food Microbiol.*, 89 (2-3): 145-154.
- WAINWRIGHT, M. (1995). *Introducción a la Biotecnología de los Hongos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza.

ANEXOS

ANEXOS

- **Anexo 1:** SANTAMARINA, M.P.; SANTIAGO, B.; ROSELLO, J. (2014). Los aceites esenciales una alternativa frente a *Fusarium sambucinum* aislado del arroz. *Phytoma España*, 254: 67-69.
- **Anexo 2:** Congreso 36^{as} Jornadas de Productos Fitosanitarios y Poster.